

Aus der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Marburg/Lahn  
(Direktor: Prof. Dr. G. W. Löhr)

**Untersuchungen  
zur Fremdproteinwirkung auf die  
Leberfunktion  
bei normalen Kaninchen  
(Teilprogramm 2)**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin  
der hohen Medizinischen Fakultät  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
**Herma Benisch**  
aus Bärn/Sud.

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg



Aus der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Marburg/Lahn  
(Direktor: Prof. Dr. G. W. Löhr)

**Untersuchungen  
zur Fremdproteinwirkung auf die  
Leberfunktion  
bei normalen Kaninchen  
(Teilprogramm 2)**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin  
der hohen Medizinischen Fakultät  
der Philipps-Universität Marburg



vorgelegt von  
**Herma Benisch**  
aus Bärn/Sud.

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Marburg am 4. 7. 1967

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät.

Dekan: Prof. Dr. med. et med. dent. habil. H. Heuser.

Referent: Prof. Dr. med. N. Lang.

Correferent: Prof. Dr. med. R. Siegert.



Inhaltsverzeichnis.

=====

|                                                                            | Seite |
|----------------------------------------------------------------------------|-------|
| A. <u>Einleitung</u>                                                       | 5     |
| B. <u>Methoden</u>                                                         |       |
| 1) Immunisierung und verwendete Proteine.                                  | 7     |
| 2) Antikörpertiterbestimmung.                                              | 7     |
| 3) ICG-Dosis und ICG-Bestimmung im Serum.                                  | 7     |
| 4) Ergebnisse zur Methodik.                                                | 8     |
| C. <u>Ergebnisse</u>                                                       |       |
| 1) Wirkung der C-GOT-Immunisierung auf die ICG-Clearance.                  | 13    |
| 2) Dosisabhängigkeit des injizierten Fremdproteins auf die ICG-Clearance.  | 20    |
| 3) Erstinjektion und Boosterung.                                           | 26    |
| 4) Beziehung der ICG-Clearance-Änderung zum Antikörperanstieg.             | 26    |
| 5) Applikationsweise.                                                      | 28    |
| 6) Wirkung der C-GOT-Immunisierung auf die J <sup>131</sup> -BR-Clearance. | 32    |
| D. <u>Besprechung der Ergebnisse.</u>                                      | 36    |
| E. <u>Zusammenfassung.</u>                                                 | 41    |
| F. <u>Literaturverzeichnis.</u>                                            | 43    |

Im Text verwendete Abkürzungen:

Ag= Antigen

Ak= Antikörper

BR= Bengalrosa

C-GOT= Glutamat-Oxalacetat-Transaminase aus  
Schweineherzcytoplasma

E= Extinktion (1= 0,001)

H (Hum.)= human

HWZ= Halbwertszeit

ICG= Indocyaningrün (Cardiogreen®)

Imp.= Impulse

i. p.= intraperitoneal

i. v.= intravenös

L. C.= Lebercirrhose

p. i.= post injektionem

Prot.= Protein

## A. Einleitung.

Der Einfluß der Leberfunktionsstörung auf die Antikörper (Ak)-Bildung ist von verschiedenen Autoren (1, 6, 8, 9, 13, 22) untersucht worden, dagegen liegen wenig Berichte über die Wirkung der Ak-Bildung auf die gesunde und die gestörte Leberfunktion vor. WILDE untersuchte 1942 die Wirkung von Gonokokkenvaccine auf die infolge gonotoxischer Schädigung gestörte Leberfunktion beim Menschen. Er fand, daß die "Leberfunktion" durch die Vaccine keineswegs verschlechtert, sondern eher verbessert wurde. Die damals angewandten Untersuchungen waren jedoch wenig leberspezifisch. Die unter den verwendeten Proben noch am ehesten spezifische Galaktosebelastung zeigte immer eine Funktionsverbesserung, auch in den Fällen, die zugleich eine BSG-Erhöhung zeigten. Die mit der BSG erfaßten Veränderungen sind größtenteils von der Leberfunktion unabhängig (27).

In der vorliegenden Arbeit wird die Reaktion der normalen Leberfunktion von Kaninchen auf die Injektion von gereinigten Fremdproteinen (Schweineherz-C-GOT, Humanalbumin, Humangammaglobulin) untersucht. Dabei wurde als Parameter der Leber-

parenchymfunktion das Blutspiegelverhalten des Farbstoffs Indocyaningrün (ICG) benutzt, welcher von verschiedenen Autoren (2, 3, 10, 11, 12, 24, 25, 26, 28) eingehend untersucht wurde und gegenüber den häufiger angewandten Farbstoffen wie Bromsulphalein (5, 10, 14, 19), Radio-Bengalrosa (7, 10, 14, 21) und Biligrafin (14) entscheidende Vorteile besitzt. CHERRICK, STEIN, LEEVY und DAVIDSON stellten 1960 fest, daß ICG vollständig durch die Leber ausgeschieden wird, die Aufnahme im extrahepatischen Gewebe minimal ist und keine Ausscheidung durch die Nieren erfolgt. Untersuchungen von HUNTON, BOLLMAN und HOFFMAN ergaben außerdem, daß keine Rückresorption durch die Leberlymphe erfolgt (12). Da das Absorptionsspektrum von ICG in einem Wellenbereich um 800 m $\mu$  liegt, wird das Ergebnis bei der photometrischen Messung im Gegensatz zu Bromsulphalein u. a. durch Hämolyse nicht verfälscht. Neben den aufgezählten Vorteilen besitzt ICG den Nachteil, daß es in wässriger Lösung (24) sowie im Serum (eigene Beobachtung) nicht länger als 24 Stunden haltbar ist.

## B. Methoden.

### 1) Immunisierung und verwendete Proteine.

Bei 60 Kaninchen untersuchten wir den Einfluß intravenöser Injektion heterologer Proteine auf die ICG-Clearance. Gruppen von 4-6 Tieren wurden mit verschiedenen isolierten Proteinen immunisiert. Als isolierte Proteine benutzten wir Humanalbumin und Humangammaglobulin in Dosen von 0,4 mg (Protein der Behring-Werke Marburg) und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (C.F. Boehringer Mannheim) in Dosen von 0,2, 0,4 und 0,8 mg ohne Adjuvans.

### 2) Antikörpertiterbestimmung.

In den Untersuchungen mit C-GOT wurde der Antikörpertiter durch Messung der Immunhemmung der Enzymaktivität bestimmt (s. dazu Lang, N. und Massarrat, S. 16, 18).

### 3) ICG-Dosis und ICG-Bestimmung im Serum.

ICG wurde in einer Dosis von 1 mg/kg (= 0,2 ml/kg)

Körpergewicht in die Ohrvene injiziert. Die Änderung der ICG-Clearance unter dem Einfluß der Immunisierung wurde mit den spontanen intraindividuellen Schwankungen in einer Kontrollgruppe von 12 nicht immunisierten Kaninchen verglichen (s. Paralleldissertation). Die ICG-Extinktion im Serum wurde im Eppendorf-Photometer (Photozelle 90 r, 1 mm Küvette) bei 772  $\mu$  gemessen. Eine Extinktion von 0,1 entspricht einer Serumkonzentration von 6,7 mg pro Liter.

#### 4) Ergebnisse zur Methodik.

Das zur Erfassung der Leberfunktion verwendete ICG hat ein Extinktionsmaximum bei 805  $\mu$ . Die im Eppendorf-Photometer verwendbare nächstgelegene Wellenlänge betrug 772  $\mu$ . Dabei fand sich eine lineare Korrelation zwischen Extinktion und Serumspiegel. Die ICG-Serumkonzentration fällt beim nicht lebergeschädigten Kaninchen nach der in Abb.1 dargestellten Funktion ab. Zum Vergleich sind die Kurven zweier anderer Spezies mit dargestellt. Der Kurvenverlauf beim Menschen mit der Dosis von 0,5 mg/kg Körpergewicht kommt dem beim Kaninchen mit der Dosis von 1 mg/kg Körpergewicht am nächsten. Die Halbwertszeit der ICG-Clearance in der Phase a(= 3. bis 8. Minute p.i.) ist beim

Menschen und beim Kaninchen gleich groß. In der Phase c (ab 15. Min. p.i.) verläuft die Kurve beim Kaninchen annähernd waagerecht, während sie beim Menschen noch weiter abfällt.

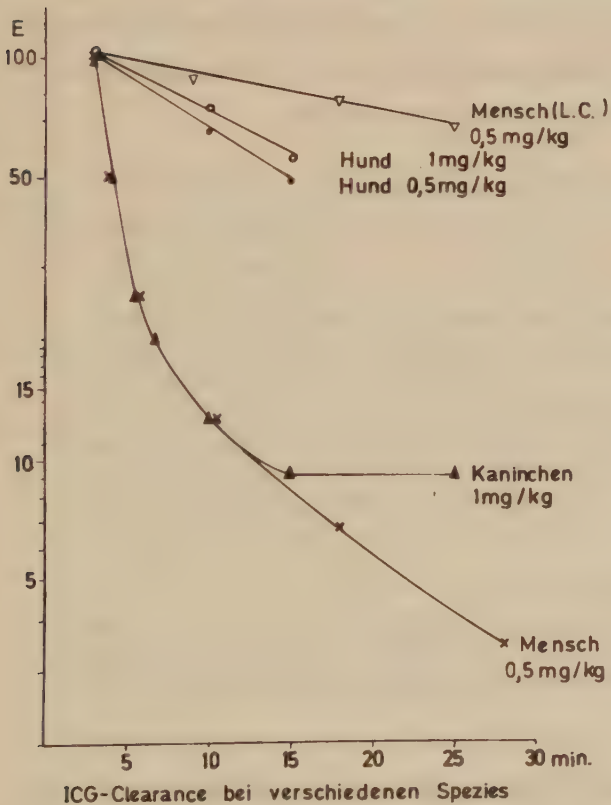


Abb. 1: Vergleich der ICG-Clearance zwischen Mensch, Kaninchen und Hund.

Die Abb. 1 zeigt weiterhin zwei Kurven vom Hund mit unterschiedlicher Dosis (0,5 und 1 mg/kg). Hier läßt die Kurve den typischen Zweiphasenverlauf vermissen, den wir bei gesunden Kaninchen finden. Der Kurvenabfall ist hier geradlinig und kommt dem Kurventyp bei Kaninchen nach  $\text{CCl}_4$ -Schädigung gleich (s. Paralleldissertation Bruck). Einen ebensolchen geradlinigen Verlauf sieht man beim Menschen mit Lebercirrhose.

Der durchschnittliche Kurventyp des ICG-Serumspiegels zeigt in der halblogarithmischen Darstellung einen Abfall nach mindestens 2 bis 3 Halbwertzeiten (nach Erreichen einer annähernd gleichmäßigen Verteilung im Blut), von denen die erste (Halbwertzeit a) und die zweite (Halbwertzeit b) überwiegend durch die Aufnahme des Farbstoffes in der Leber bestimmt sind, während der spätere, wesentlich flacher abfallende Kurventeil (Halbwertzeit c) durch die nunmehr erreichte Aufsättigung der Speicher oder der Ausscheidungskapazität der Leber wesentlich mitgeprägt wird (Abb. 2).

Als Kriterien der Aufnahmekapazität der Leber für ICG werteten wir die Halbwertzeit des steilen Kurvenverlaufs von der 3. bis zur 8. Minut.p.i., die in einer positiven Korrelation zur absoluten

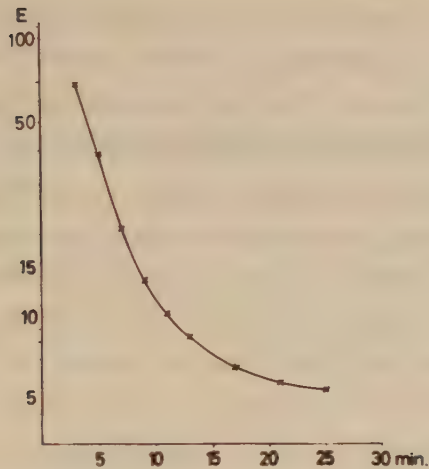


Abb. 2: Durchschnittliche ICG-Clearance bei  
12 Kaninchen.

Halbwertszeit a: 3. bis 8. Minute p.i.

Halbwertszeit b: bis 15. Minute p.i.

Halbwertszeit c: ab 15. Minute p.i.

ICG-Extinktion im Serum 10 Minuten p.i. steht (Abb. 3). (Die Normwerte unserer Kaninchen sind die Zeichen innerhalb des Rechtecks; jeweils ein Zeichen entspricht einem Versuchstier.) Daß diese beiden Kriterien (Halbwertszeit a und 10-Minuten-Extinktion) in Beziehung zur Leberfunktion stehen, zeigt die Verschiebung der Werte nach rechts oben

unter dem Einfluß einer Leberschädigung durch  $\text{CCl}_4$ -Intoxikation (s. Kurventeil rechts oberhalb des Normbereichs in Abb. 3). Die Normwerte des ICG-Blutspiegels wurden größtenteils erst 16 bis 20 Tage nach  $\text{CCl}_4$ -Intoxikation wieder erreicht (= weiße Zeichen im Normbereich der Abbildung).

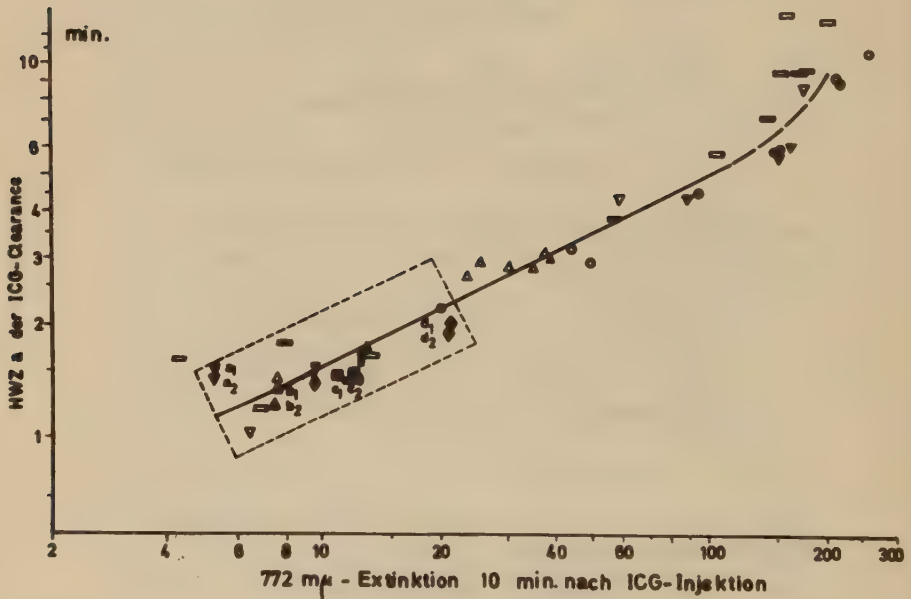


Abb. 3: Beziehung der Halbwertszeit a der ICG-Clearance in Beziehung zur ICG-Extinktion (10 Min. p.i.) bei normalen (eingerahmtes Feld) und mit  $\text{CCl}_4$ geschädigten Tieren.

## C. Ergebnisse.

=====

### 1) Wirkung der C-GOT-Immunisierung auf die ICG-Clearance.

Die intravenöse Injektion von 18 U Schweineherz-C-GOT (= 0,2 mg Protein) bewirkte sowohl beim nicht immunisierten als auch beim C-GOT vorimmunisierten Tier (Abb. 4) eine anhaltende Verbesserung der C-GOT-Clearance, bereits 15 Minuten nach C-GOT-Injektion (s. Kurve 0,01 Tag p.i.) mit einer erheblichen Abnahme der ICG-Serumextinktion gegenüber der Normalkurve der gleichen Tiere (dick ausgezogene Linie) erkennbar, die sich etwa von der 10. bis 15. Minute nach ICG-Injektion ab bemerkbar macht; die Kurve zu diesem Zeitpunkt verläuft im allgemeinen länger in der steilen Phase und erreicht manchmal im Gegensatz zur Normalkurve (Tiere ohne Vor- und Nachbehandlung) kein Plateau. Es scheint also, daß infolge einer gleichzeitigen Verbesserung von Leberaufnahme und Ausscheidung des ICG ein Sättigungspunkt gar nicht oder erst später als normal erreicht wird.

Teilweise kommt es dann 1-2-3 Tage nach C-GOT-Injektion zu einer zunehmenden Angleichung an

die Normalkurve und später erneut zur Clearance-verbesserung. Die Serumkurven liegen auch nach 8 bis 35 Tagen noch unterhalb der Normalkurven des betreffenden Tieres, lassen aber jetzt wieder das ursprüngliche Plateau erkennen. Dieser Effekt wurde in allen vier durchgeführten Untersuchungen erzielt. In den Fällen mit Boosterung war kein Unterschied festzustellen.

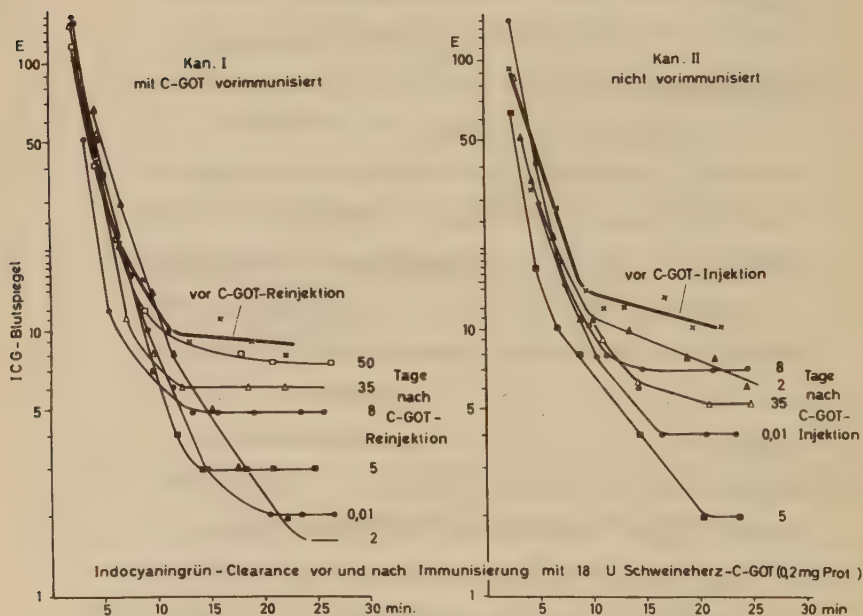


Abb. 4: ICG-Clearance vor und nach Immunisierung mit 18 U Schweineherz-C-GOT (= 0,2 mg Protein).

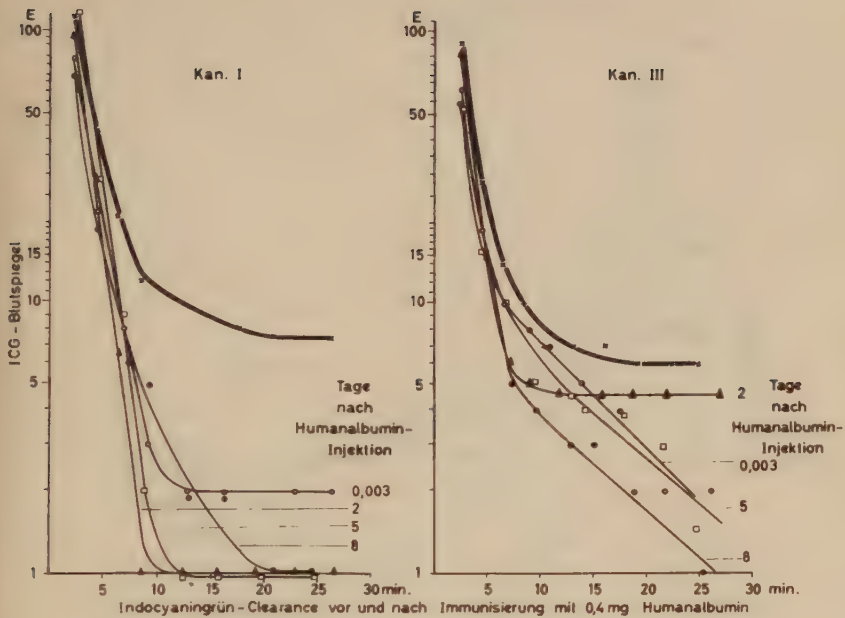


Abb. 5: Wirkung von 0,4 mg Humanalbumin i.v. bei einem mit C-GOT immunisierten (Kaninchen I) und einem nicht immunisierten Tier (Kaninchen III).

Auch bei Injektion zweier anderer Proteine, nämlich Humanalbumin (Abb. 5, 2 Versuche) und Humangammaglobulin (Abb. 6, 2 Versuche) kommt es zu einer schnelleren und stärkeren ICG-Elimination aus dem Blut. Die größte Verbesserung der Ausscheidung war hier z. T. bereits fünf Minuten nach

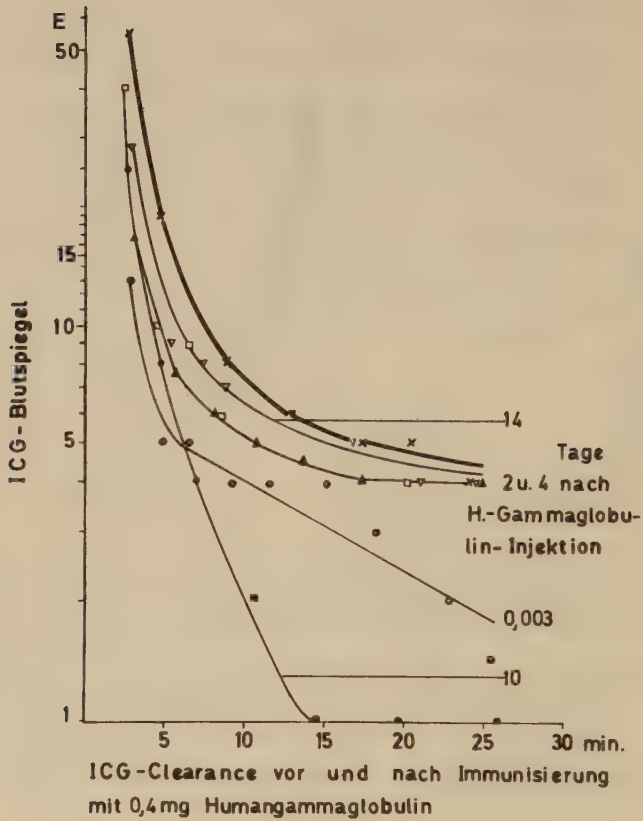


Abb. 6: Wirkung von 0,4 mg Humangammaglobulin  
i.v. auf die ICG-Clearance bei einem  
Normaltier.

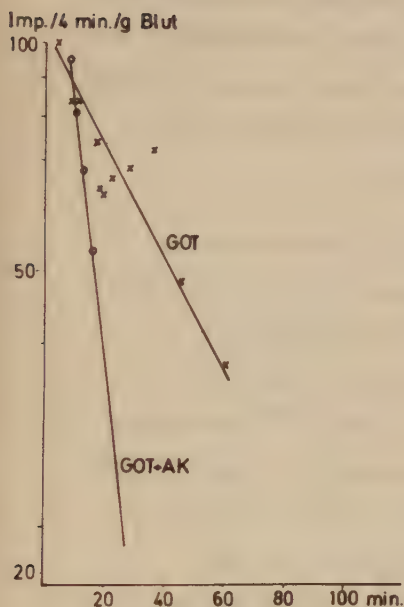


Abb. 7: ○—○ Verschwinderate  
eines i.v. injizier-  
ten Ag-Ak-Komplexes  
aus dem Blut bei einem  
nicht mit C-GOT immuni-  
sierten Tier.  
X—X Verschwinderate  
von mit  $J^{131}$  markierter  
C-GOT aus dem Blut.  
Die Impulse sind durch  
5 zu teilen.

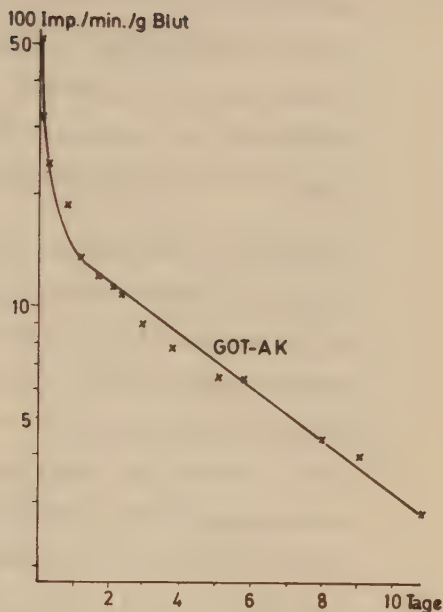


Abb. 8: Halbwertszeit  
von 0,3 ml i.v.  
injizierten  
mit  $J^{131}$ -mar-  
kierten Kanin-  
chen-Antikör-  
pern (gegen  
C-GOT).

intravenöser Injektion erreicht und im Ausmaß dem 15-Min.-C-GOT-Effekt vergleichbar. Der Effekt 8 Tage nach der Injektion war beim Albumin noch größer als der Soforteffekt (zu späteren Zeitpunkten hier nicht untersucht).

Dieser sehr lange anhaltende Effekt einer einmaligen Injektion einer kleinen Fremdproteindosis hat keine Korrelation zur Verweildauer des betreffenden Proteins im Blut der Tiere; die biologische Halbwertszeit der mit  $J^{131}$  markierten C-GOT beträgt nur einen Bruchteil der vom Albumin und Gammaglobulin, nämlich bei einem nicht immunisierten Tier ca. 40 Minuten und ist beim gleichen Tier bei zusätzlicher Injektion von C-GOT-Antikörpern (also bei Imitation der Bedingung einer vorangegangenen C-GOT-Immunsierung mit noch vorhandenen zirkulierenden Antikörpern) noch wesentlich kürzer (Abb. 7). Also gleicher Effekt von Erstimmunisierung und Boosterung auf die ICG-Clearance trotz unterschiedlicher (und sehr kurzer) C-GOT-Verweildauer im Blut.

Die Injektion von Kaninchengammaglobulin (Abb. 9) bewirkt i.G. zu der von Humangammaglobulin verständlicherweise keinerlei Änderung der ICG-Exkretion (s. später besprochene Versuche).

Es handelt sich also bei der Clearancebeeinflussung der Proteine sicher um einen antigenen Effekt.

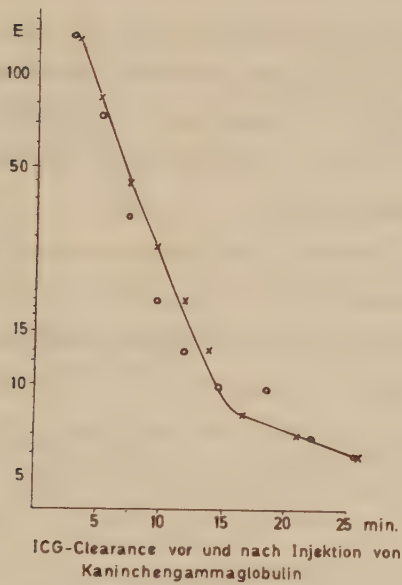


Abb.9: Wirkung von 1 ml Kaninchen-gammaglobulin i.v. auf die ICG-Clearance bei einem mit C-GOT vorimmunisierten Tier.

2) Dosisabhängigkeit des injizierten Fremdproteins  
auf die ICG-Clearance.

Bei den Untersuchungen der Wirkung eines Fremdproteins auf die Leberfunktion verwendeten wir zum größten Teil (in 8 Fällen) 0,4 mg Protein in 0,2 ml Schweineherz-C-GOT (Abb. 10). Wir injizierten das Fremdprotein zwischen 5 und 10 Minuten nach der ICG-Injektion und konnten keinen Soforteffekt feststellen; 2 Tage nach der Fremdproteininjektion aber zeigte sich deutlich eine ICG-Ausscheidungsverbesserung, die nach 4 bis 5 Tagen ihr Maximum erreichte, dann langsam wieder zur Norm zurückkehrte; am 10. Tage nach der Injektion etwa war der Ausgangswert der ICG-Clearance wieder erreicht. Um eine eventuelle Dosisabhängigkeit zu prüfen, injizierten wir zwei Kaninchen 0,8 mg Protein in 0,4 ml C-GOT und vier Kaninchen 0,2 mg Protein in 0,1 ml C-GOT (Abb. 4 und 11). Dabei fanden wir, daß die Dosis von 0,8 mg Protein keine so konstante Verbesserung der ICG-Ausscheidung bewirkte wie die halbe Dosis. In einem der beiden Versuche mit 0,8 mg Protein zeigte sich am 2. Tag nach der Injektion eine Verbesserung der ICG-Clearance, welche am 4. Tage p.i. bereits in der Phase a (= steller Kurvenabfall von der 3. bis zur 8. Minute) die Norm erreicht hatte, in der

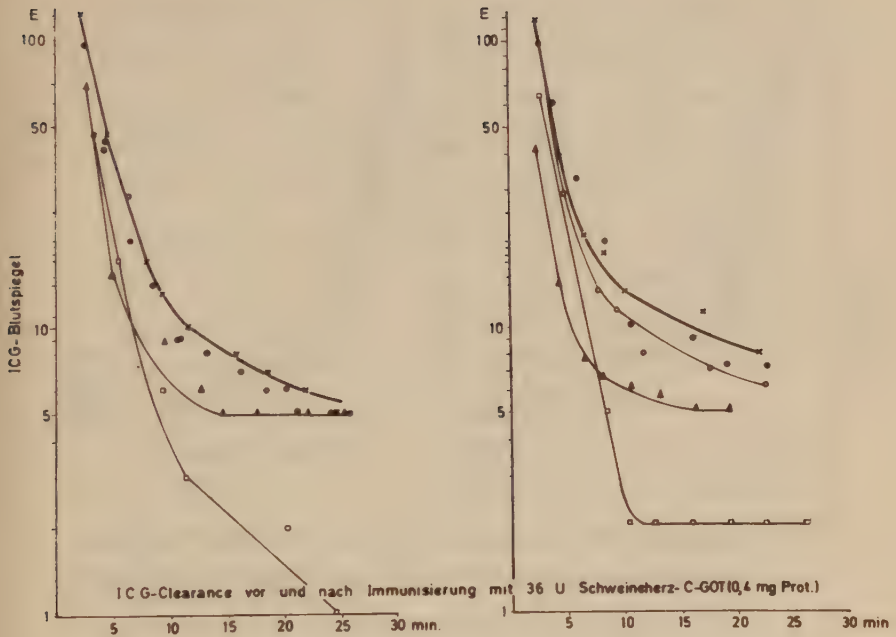


Abb. 10: Wirkung von 0,2 ml C-GOT (= 0,4 mg Protein) auf die ICG-Clearance.

x—x Normalkurve

o—o Sofortwirkung (C-GOT-Injektion bei 5 Minuten).

△—△ 2 Tage

□—□ 4 Tage

●—● 10 Tage

} nach C-GOT-Injektion.

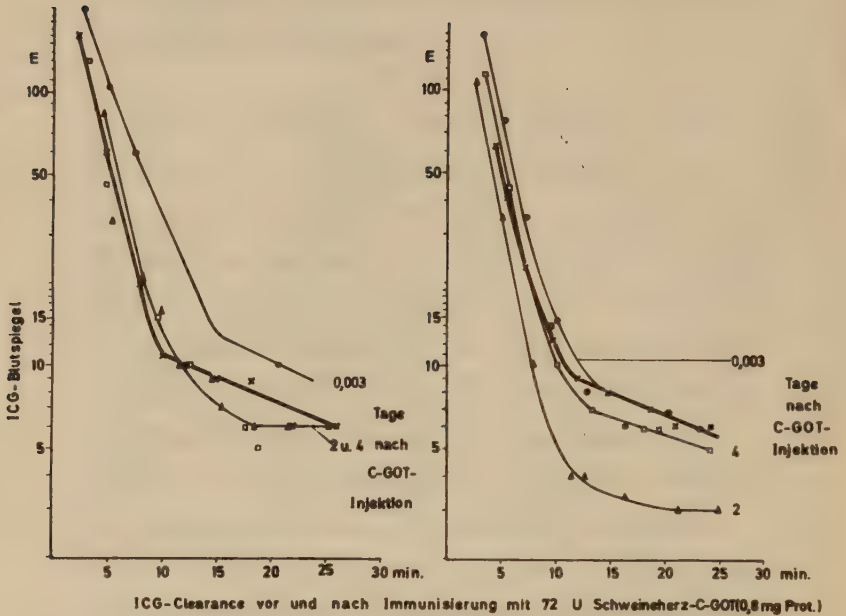


Abb. 11: Sofortwirkung von 0,4 ml C-GOT (= 0,8 mg Protein) auf die ICG-Clearance.

Phase b (= flacher Kurvenverlauf von der 15. zur 20. Minute) jedoch noch eine geringe Ausscheidungsverbesserung erkennen ließ. 7 Wochen später zeigte eine wiederholte Prüfung der ICG-Clearance eine deutliche, hauptsächlich in der Phase b gelegene Ausscheidungsverbesserung. In dem zweiten Versuch mit 0,8 mg Protein in 0,4 ml C-GOT konnte keine oder höchstens eine minimale Verbesserung der

Leberfunktion am 2. und 4. Tag nach der Injektion festgestellt werden. In diesem Fall zeigte eine wiederholte Prüfung der ICG-Clearance 7 Wochen später keine so ausgeprägte Ausscheidungsverbesserung wie im Parallelversuch (in der Abb. nicht dargestellt). Bei den Versuchen mit 0,2 mg Protein (Abb. 4) setzte sofort, d.h. 5 bzw. 15 Minuten p.i. eine Verbesserung der ICG-Ausscheidung ein. In den 2 dargestellten Fällen war deutlich ein Zweiphasenverlauf zu erkennen, insofern als am 2. Tag p.i. die ICG-Ausscheidung sich der Norm näherte, am 5. Tag p.i. aber wieder eine beschleunigte ICG-Ausscheidung zu erkennen war. Diese verbesserte ICG-Ausscheidung konnte bis zum 35. Tag, in einem Fall sogar bis zu 7 Wochen nach der C-GOT-Injektion nachgewiesen werden. Die beiden Parallelversuche zeigten den Zweiphasenverlauf nicht so deutlich. Es war auch hier ein Soforteffekt zu sehen, in den folgenden Tagen aber verhielt sich die ICG-Ausscheidung unterschiedlich gegenüber der ICG-Clearance in Abb. 4. Am 2. Tag nach der Injektion war die ICG-Ausscheidung gleich dem Soforteffekt. Am 4. Tag p.i. war in einem Fall die Normalkurve bereits erreicht, während im zweiten Fall die ICG-Ausscheidung noch eine fragliche Verbesserung zeigte. Am 10. Tage p.i. war hier gegenüber dem 4. Tag p.i. wieder eine beschleunigte ICG-Aus-

scheidung zu sehen. Ein Kontrollversuch nach ca. 7 Wochen ließ auch hier noch eine deutliche ICG-Ausscheidungsverbesserung erkennen. Im anderen Fall zeigte der Kontrollversuch der ICG-Clearance nach ca. 5 Wochen, nachdem eine zwischenzeitliche Makrodexinjektion stattgefunden hatte, eine Verschlechterung der ICG-Ausscheidung gegenüber den Normalbestimmungen, möglicherweise infolge einer Makrodexeinwirkung.

Aus den oben beschriebenen Versuchen war eine deutliche Dosisabhängigkeit zu sehen. Die kleinste Dosis von 0,2 mg C-GOT bewirkte einen Soforteffekt, während dieser bei den Versuchen mit höheren Dosen in keinem Fall nachzuweisen war. Außerdem konnte bei der kleinsten Dosis von C-GOT die beschleunigte ICG-Ausscheidung über Wochen hinaus gesehen werden. Bei den höheren Dosen von C-GOT (0,4 und 0,8 mg) war nur ein Späteffekt zu verzeichnen, welcher bei der Dosis von 0,4 mg am 2. Tag p.i. einsetzte, am 4. Tag sein Maximum erreichte und dann wieder langsam zur Norm zurückkehrte. Bei der Dosis von 0,8 mg C-GOT war am 2. Tag wohl auch mehr oder weniger eine Ausscheidungsverbesserung zu sehen, am 4. Tag p.i. aber war diese bereits nicht mehr nachweisbar. In einem der beiden Versuche mit 0,8 mg C-GOT

war 5 Minuten p. i. sogar eine Verschlechterung der ICG-Ausscheidung zu sehen. Vergleiche hierzu Tabelle I, welche die 10-Minuten-Extinktion der ICG-Ausscheidungsveränderung in Prozent bei den einzelnen Tieren und bei verschiedenen Dosen C-GOT zeigt.

| Immunisierung mit C-GOT |     |     |     |     |     |     |
|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| mg Prot.                | 0,2 |     | 0,4 |     | 0,8 |     |
| Kan. Nr.                | I   | II  | III | IV  | V   | VI  |
| vor Prot.Inj.           | 0%  | 0%  | 0%  | 0%  | 0%  | 0%  |
| 15 Min.                 | 37% | 33% | 0%  | 0%  | 0%  | 0%  |
| 2 Tage                  | 17% | 52% | 54% | 86% | 60% | 67% |
| 5 Tage                  | 48% | 33% | 54% | 91% | 60% | 33% |
| 10 Tage                 | 23% | 64% | 35% | 49% | -   | -   |

Tab.I: Änderung der 10-Min.-Extinktion in Prozent nach Injektion verschiedener Dosen C-GOT (0,2, 0,4 und 0,8 mg Prot.) bis zum 10. Tag p. i.

### 3) Erstinjektion und Boosterung.

Unsere Versuche führten wir teilweise bei Normaltieren, teilweise bei mit 0,2 ml C-GOT plus 0,2 ml Aluminiumhydroxydgel etwa 1/2 Jahr zuvor vorimmunisierten Tieren durch. Die Applikation des Fremdproteins bei der Vorimmunisierung fand intraperitoneal statt. Bei unseren Ergebnissen fanden wir in der Wirkung auf die Verschwinderate von ICG keinen Unterschied zwischen Erstinjektion und Boosterung (Abb. 4,5).

### 4) Beziehung der ICG-Clearance-Änderung zum Ak-Anstieg.

Bei den Versuchen mit immunisierten Kaninchen untersuchten wir die Beziehung zwischen der Ak-Bildung nach der Boosterung und dem Maximum der ICG-Ausscheidungsverbesserung (Abb. 12). Dabei fanden wir, daß in allen Fällen die Verbesserung der ICG-Clearance der Ak-Bildung vorausgeht. Bei dem beobachteten Antigeneffekt scheint es sich um die Beeinflussung nur einer Partialfunktion der Leber zu handeln. Der vom Leberparenchym aufgenommene und ausgeschiedene Farbstoff ICG wird unter dem Einfluß einer Mesenchymaktivierung durch

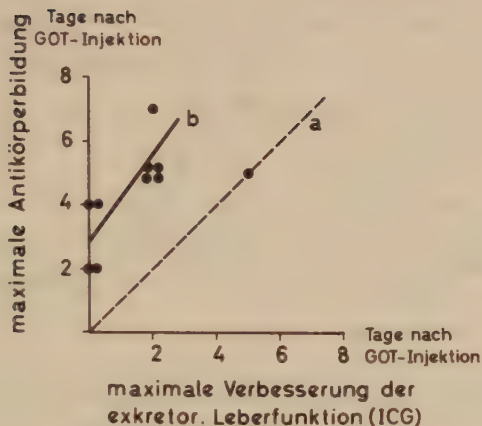


Abb. 12: Zeitliche Beziehung zwischen dem Maximum der Ak-Bildung und dem Maximum der ICG-Clearance-Änderung (10-Min.-Wert) nach Injektion von 0,1 ml, 0,2 ml und 0,4 ml C-GOT.

Fremdproteininjektion schneller aus der Blutbahn eliminiert.

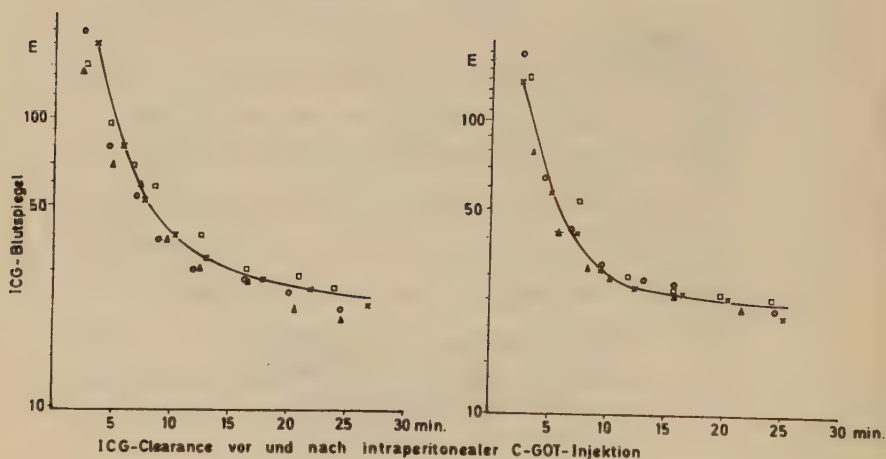


Abb. 13: Wirkung der i.p.-Injektion von 0,2 ml C-GOT mit 0,2 ml Freund'Adjuvans auf die ICG-Clearance am 2. (O-O), 5. (Δ-Δ) und 10. (□-□) Tag nach der Injektion bei zwei nicht mit C-GOT vorimmunisierten Tieren.

##### 5) Applikationsweise.

In den vorangegangenen Versuchen untersuchten wir die Wirkung von C-GOT auf die ICG-Clearance nach intravenöser Injektion. In den folgenden vier Versuchen (in Abb. 13 zwei Versuche darge-

stellt) injizierten wir das Fremdprotein intra-peritoneal. Dazu verwendeten wir 0,2 ml C-GOT (= 0,4 mg Protein) mit 0,2 ml Freund'Adjuvans. Wir untersuchten die Wirkung auf die ICG-Ausscheidung 2, 5 und 10 Tage nach der Injektion. In allen vier Fällen lag der Kurvenverlauf der ICG-Clearance innerhalb der intraindividuellen Schwankungsbreite der Normalbestimmungen (s. Paralleldissertation). Das Fehlen des Fremdproteineffektes auf die ICG-Clearance kann sowohl im abweichenden Applikationsort als auch im Zusatz des Adjuvans begründet sein (verzögerte Freigabe des adsorbierten Antigens, evtl. auch in anderer Form). Eine Abklärung des Befundes setzt weitere noch nicht durchgeführte Versuchsserien mit Modifikation der Fremdproteindosis, Weglassen des Adjuvans usw. voraus.

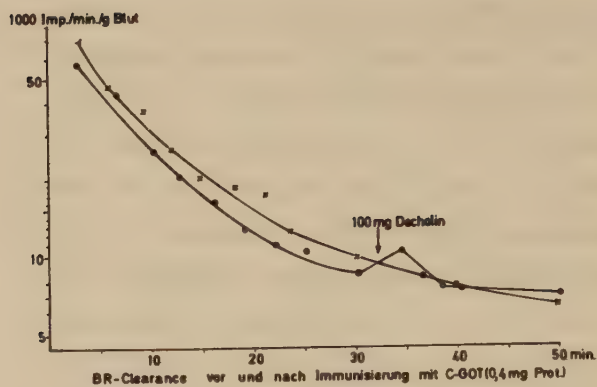


Abb. 14 a

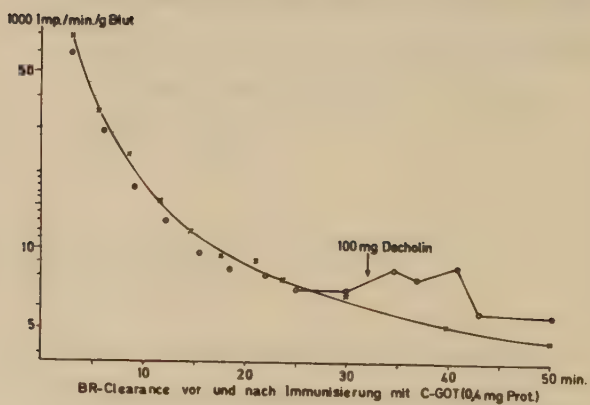


Abb. 14 b

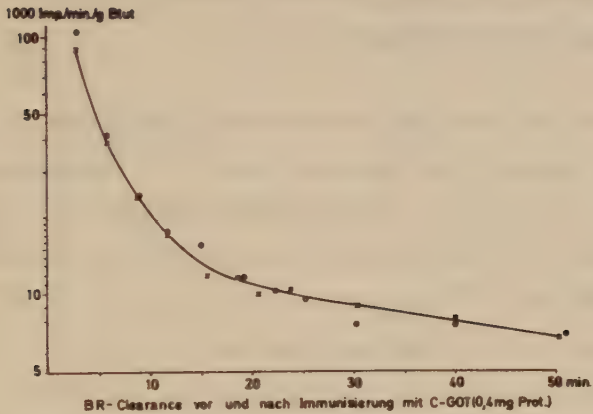


Abb. 14 c

Abb. 14 a-c: Wirkung von 0,2 ml C-GOT (= 0,4 mg Prot.) auf die  $J^{131}$ -BR-Clearance 5 Tage (O—O) nach der Fremdprotein-Injektion. Die Abbildungen a und b zeigen zusätzlich die Wirkung von 100 mg Decholin.

6) Wirkung der C-GOT-Immunisierung auf die  $J^{131}$ -  
Bengalrosa-Clearance.

In einigen Versuchen benutzten wir als Leberfunktionsprobe die Clearance von  $J^{131}$ -Bengalrosa statt der von ICG. Bei den Untersuchungen der Wirkung von 0,2 ml C-GOT (= 0,4 mg Prot.) bestimmten wir die  $J^{131}$ -Bengalrosa-Verschwinderate am 5. Tag nach der Antigen-Injektion, da wir zu diesem Zeitpunkt die maximale Wirkung des Fremdproteins auf die ICG-Clearance sahen. Der erwartete Effekt auf die  $J^{131}$ -BR-Clearance blieb jedoch in allen drei untersuchten Fällen aus (Abb. 14 a-c).

Bei den Versuchen mit 0,1 ml C-GOT (= 0,2 mg Prot.) bestimmten wir die  $J^{131}$ -BR-Verschwinderate 5 Minuten und 2 Tage nach der Antigen-Injektion. Hier zeigte die 5-Min.-Wirkung i. G. zu der auf die ICG-Clearance eher eine Ausscheidungsverzögerung. Am 2. Tag nach der Injektion lag die BR-Clearance in zwei von drei Fällen im Normbereich (Abb. 15 a und c), im dritten Fall zeigte sie eine geringe Verbesserung (Abb. 15 b). In den Abbildungen 15 a und b ist gleichzeitig die ICG-Clearance mit dargestellt.

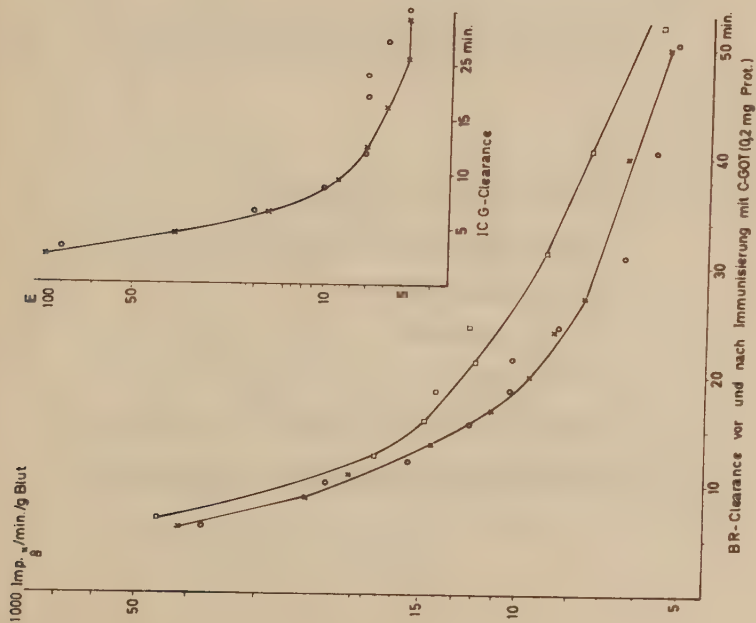


Abb. 15 a

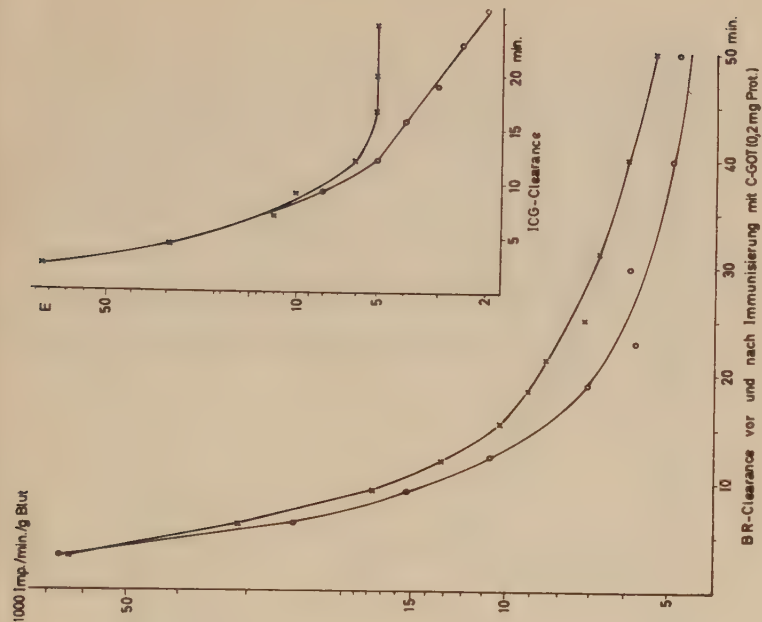


Abb. 15 b

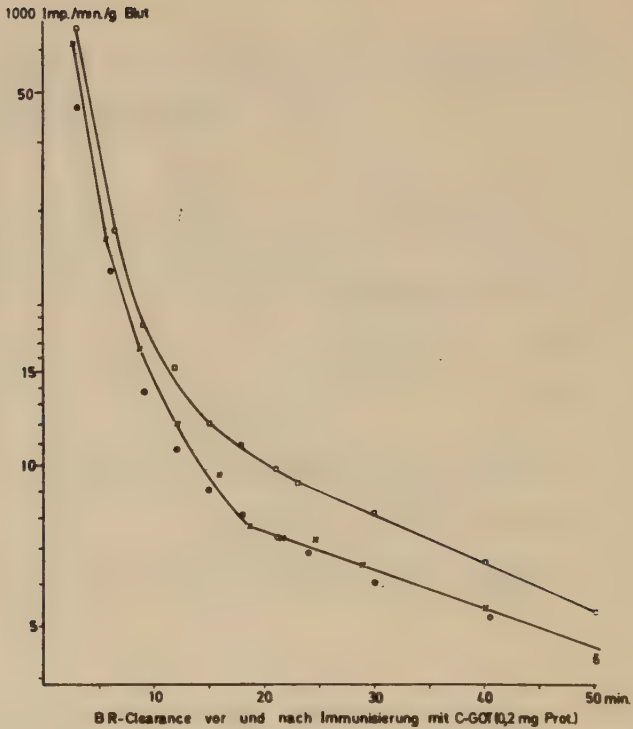


Abb. 15 c

Abb. 15 a-c: Wirkung von 0,1 ml C-GOT (= 0,2 mg Prot.) auf die  $J^{131}$ -BR-Clearance.

X-X Normalkurve

□-□ 5 Minuten } nach der Fremdpro-  
○-○ 2 Tage } tein-Injektion.

In den Abbildungen a und b ist gleichzeitig die ICG-Clearance dargestellt.

Die  $J^{131}$ -Bengalrosa-Clearance wurde durch zusätzliche Dehydrocholsäure-Injektion (Decholin 75 mg) 25 Minuten nach  $J^{131}$ -BR-i.v.-Injektion leicht beschleunigt (2 Versuche in Abb. 16), nicht jedoch anscheinend, wenn die Tiere 5 Tage zuvor mit 0,4 mg C-GOT immunisiert worden waren; dann kam es zu einem geringen BR-"Rückholeffekt" ins Blut (Abb. 14 a und b).

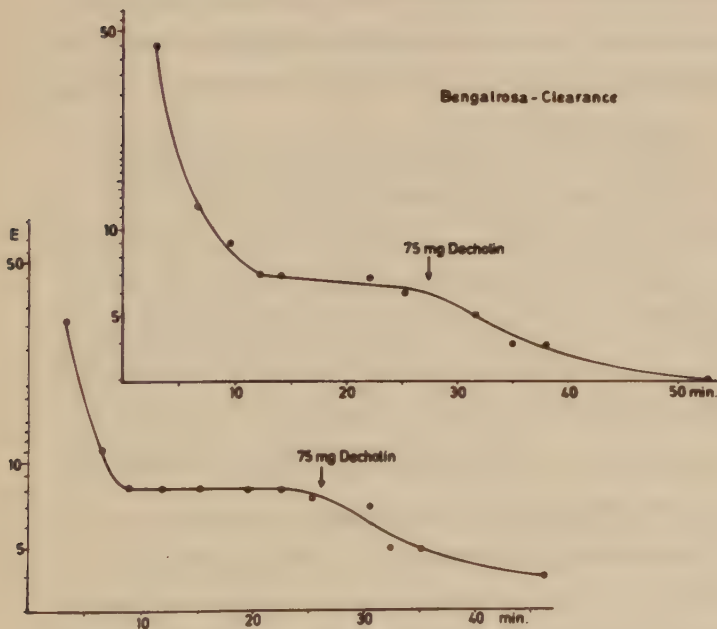


Abb. 16: Wirkung von 75 mg Decholin auf die  $J^{131}$ -BR-Clearance bei zwei nicht mit C-GOT immunisierten Tieren.

#### D. Besprechung der Ergebnisse.

=====

Um eine eventuelle Beziehung zwischen Leberparenchym- und Mesenchymfunktion zu untersuchen, injizierten wir den Tieren zur Aktivierung des RES ein Fremdprotein. Zur Untersuchung der Leberparenchymfunktion benutzten wir Indocyaningrün (ICG), das ohne Beteiligung des Mesenchyms ausschließlich von der Leber ausgeschieden wird, im Gegensatz zu kolloidalen Partikellösungen von z.B. Radiogold, die zunächst vom RES aufgenommen werden.

Bei unseren Untersuchungen fanden wir, daß unter der Einwirkung des Fremdproteins bei allen 16 untersuchten Kaninchen ICG beschleunigt aus der Blutbahn eliminiert wurde. Dabei war die negative Korrelation zur Dosis auffällig. Eine Injektion von 0,2 mg Schweineherz-C-GOT bewirkte in den vier untersuchten Fällen eine sofortige (5 bzw. 15 Min. nach der Injektion) ICG-Ausscheidungsverbesserung, die über Wochen anhielt. Dagegen fehlte bei den Versuchen mit der doppelten (8 Fälle) und vierfachen (2 Fälle) Antigen-Dosis der Soforteffekt, während der Späteffekt (2 Tage nach der Injektion) in allen 10 untersuchten Fällen vorhanden war. Die Normalkurven waren hier spätestens am 10. Tag p. i.

wieder erreicht. Während die Versuche mit verschiedenen Dosen einen unterschiedlichen Effekt auf die ICG-Clearance zeigten, war kein Unterschied bei Verschiedenheit der Speziesherkunft des Fremdproteins zu sehen; Human-Albumin und Human-Gammaglobulin bewirkten eine ähnliche ICG-Ausscheidungsverbesserung wie das Schweineherzprotein. Bei den Humanproteinen führte jedoch eine Menge von 0,4 mg zu einem Soforteffekt, i. G. zur Wirkung von C-GOT, wo wir einen Soforteffekt nur bei der Dosis von 0,2 mg Protein sehen konnten. Aus dem Kurvenverlauf der ICG-Clearance nach Fremdproteineinwirkung (schneller Kurvenabfall, in den ersten Minuten p. i. steiler und länger anhaltend als in der Normalkurve) ist zu sehen, daß der "Sättigungspunkt" der Leberaufnahme später erreicht wird. Diese Beobachtung spricht dafür, daß die Leberexkretion voraussichtlich gesteigert wird. Es bleibt die Frage zu klären, auf welche Weise eine solche Exkretionssteigerung bewirkt wird.

Es ist wenig wahrscheinlich, daß das injizierte Protein die Leberzellen direkt stimuliert; dann dürfte die höhere Ag-Dosis einen größeren Effekt auf die ICG-Verschwinderate haben als eine niedrigere Dosis, da bei höherer Dosierung mehr Antigen von den Leberzellen aufgenommen wird (4). In

unseren Untersuchungen führte gerade die kleinste Proteinmenge zu einer maximalen ICG-Ausscheidungsverbesserung.

Es scheint, daß entweder mit der ICG-Clearance eine Änderung der Mesenchymfunktion erfaßt wird oder aber, daß gleichzeitig mit einer Aktivitätssteigerung eine solche des Parenchyms einhergeht. Da STEIN, CHERRICK, LEEVY und DAVIDSON (3) durch eingehende Untersuchungen festgestellt haben, daß Indocyanningrün nur von den Leberparenchymzellen aufgenommen und ausgeschieden wird, scheint eher die zweite Erklärung zuzutreffen.

Bei den Untersuchungen, ob Boosterung gegenüber einer einmaligen Fremdproteininjektion einen Unterschied der Leberexkretion bewirken würde, fanden wir keine Abweichung. In diesem Zusammenhang interessiert vielleicht eine Untersuchung von MALLÉN und VEGA. Die Autoren stellten fest, daß allergische Phänomene keinen schädigenden Einfluß auf die Leberfunktion haben (7, 23).

SCHMENGLER jedoch sah bei seinem Beobachtungsgut parenchymatöse Leberschädigungen (20). In beiden Fällen handelt es sich um die Untersuchung der allergischen Erscheinungen beim Menschen.

Bei der intraperitonealen Applikation des Fremd-

proteins blieb der erwartete Effekt auf die ICG-Clearance aus. Wir injizierten in diesen Fällen 0,4 mg C-GOT mit 0,2 ml Freund'schem Adjuvans. Auf Grund der Versuchsanordnung kann keine Aussage darübergemacht werden, ob das Fehlen des Fremdproteineffektes auf dem abweichenden Applikationsort oder auf der gleichzeitigen Gabe des Adjuvans beruht, z. B. über eine verzögerte Freigabe des adsorbierten Antigens.

Bei den vergleichenden Untersuchungen des Ag-Effektes auf die Leberfunktion mit der  $J^{131}$ -Bengalrosa-Clearance konnten wir in keinem der sechs Fälle eine dem ICG entsprechende BR-Exkretionsverbesserung nachweisen. Es scheint sich somit bei dem beobachteten Ag-Effekt um die Beeinflussung nur einer Partialfunktion zu handeln. Die Bengalrosa-Clearance hängt von zusätzlichen Faktoren in der Leberzelle ab, da  $J^{131}$ -BR entgegen dem ICG an Glucuronsäure gekoppelt wird (3). BR stellt außerdem ein Gemisch aus mehreren Komponenten dar, weshalb hierbei Reproduzierbarkeit und Standardisierung schwierig sind (10). Auch konnte BR nicht in einer dem ICG äquimolaren Dosis injiziert werden.

Bei den Versuchen, bei denen es infolge i. v.-

Injektion von 100 mg Dehydrocholsäure ca. 30 Minuten nach  $J^{131}$ -BR-Injektion zu einer leichten Wiedereinschwemmung von Bengalrosa ins Blut kam, scheint es sich um einen exkretorischen Engpaß zu handeln (15). Dieser Effekt spricht dafür, daß Bengalrosa bei den immunisierten Tieren (5 Tage zuvor 0,4 mg C-GOT i. v.-Injektion) ca. 30 Minuten nach der Injektion sich noch teilweise in "leicht verdrängbarer" Form befindet. In zwei Versuchen bewirkte i.v.-Injektion von 75 mg Dehydrocholsäure etwa 20 Minuten nach der Bengalrosa-Injektion eher eine beschleunigte Elimination des Bengalrosa aus der Blutbahn. Hierzu muß bemerkt werden, daß die Tiere in diesem Fall nicht mit C-GOT vorimmunisiert waren.

E. Zusammenfassung.

=====

- 1) Es wird über die Untersuchung der Leberfunktion mit Indocyaningrün unter dem Einfluß verschiedener Fremdproteine bei Kaninchen berichtet.
- 2) Bei allen 16 untersuchten Tieren wurde eine Verbesserung der ICG-Clearance festgestellt, gleichgültig ob Schweineherz-C-GOT, Human-Albumin oder Human-Gammaglobulin als Fremdprotein i. v. injiziert worden war.
- 3) Es bestand eine deutliche Dosisabhängigkeit dieser Wirkung, die bei der C-GOT-Wirkung geprüft wurde. Eine höhere Dosis hatte einen kleineren und weniger lange anhaltenden Effekt als eine niedrigere Dosis.
- 4) Zwischen vorimmunisierten und nicht immunisierten Tieren zeigte sich kein Unterschied.
- 5) Von deutlichem Einfluß war die Applikationsweise. Während bei allen intravenösen Fremdprotein-Injektionen eine verbesserte ICG-Ausscheidung nachweisbar war, blieb diese bei den intraperitonealen Injektionen aus.

- 6) Bei den immunisierten Tieren ging das Maximum der ICG-Ausscheidung dem Maximum der Antikörper-Bildung voraus.
- 7) In 6 Fällen wurde die C-GOT-Wirkung auf die Leberfunktion mit  $J^{131}$ -Bengalrosa untersucht. Hierbei zeigte sich kein sicherer Effekt, obwohl in zwei Fällen die zusätzlich untersuchte ICG-Clearance leicht verbessert wurde.
- 8) Intravenöse Injektion von Dehydrocholsäure (Decholin) ca. 30 Minuten nach der Bengalrosa-Injektion (2 Versuche) bewirkte beim nicht immunisierten Kaninchen eine Beschleunigung der BR-Elimination aus der Blutbahn, beim immunisierten Tier (2 Versuche) dagegen eine leichte BR-Wiedereinschwemmung ins Blut.

F. Literaturverzeichnis.

=====

- 1 Cherrick, G.R., Potuier, L., Dufour, J.-J. and Sherlock, S.: Immunologic response to tetanus toxoid inoculation in patients with hepatic cirrhosis. New Engl. J. Med. 261, 340 (1959).
- 2 Cherrick, G.R., Stein, S.W., Leevy, C.M. and Davidson, Ch.S.: Indocyanine green clearance: A test of liver excretory function. Clin. Res. 7, 290 (1959).
- 3 Cherrick, G.R., Stein, S.W., Leevy, C.M. and Davidson, Ch.S.: Indocyanine green: Observations on its physical properties, plasma decay and hepatic extraction. J. of Clin. Invest. 39, I, 592 (1960).
- 4 Crampton, Ch.F. and Haurowitz, F.: Deposition of small doses of injected antigen in rabbits. J. Immunol. 69, 457 (1952).
- 5 Demling, L.: Über die Durchblutung der Leber. Dtsch. Med. Wschr. 16, 847 (1963).
- 6 Delaloye, B. et Cruchaud, S.: Mesure de l'activité phagocytaire du système reticuloendothélial en clinique par l'albumine humaine

- denaturée marquée à l' $J^{131}$ . Considérations sur la mesure de la circulation hépatique dans la cirrhose. Schweiz. med. Wschr. 90, 1155 (1960).
- 7 Glaubitt, D., Haacke, W. und Wolf, R.: Die Differentialdiagnose von Lebererkrankungen unter Verwendung von  $J^{131}$ -Bengalrosa. Vortrag auf der 70. Tagung der Dtsch. Ges. f. Inn. Med. 6.4.-9.4. 1964.
  - 8 Hadnagy, C. und Gyergyay, F.: Die Wirkung der hepatotoxischen Stoffe auf die Antikörperbildung. Z. Imm. Forsch. 115, 357 (1958).
  - 9 Havens, W.P., Myerson, R.M. and Klatchko, J.: Production of tetanus antitoxin by patients with hepatic cirrhosis. New Engl. J. Med. 257, 637 (1957).
  - 10 Henly, K.S., Schmidt, W., Schmidt, E.: Newer diagnostic tests in liver disease. Progress in Liver Disease 15, 216 (1961).
  - 11 Hunton, D.B., Bollman, J.L. and Hoffman, H.N.: Studies of hepatic function with indocyanine green. Gastroenterology 39, 713 (1960).
  - 12 Hunton, D.B., Bollman, J.L. and Hoffman, H.N.: The plasma removal of Indocyanine green and

- Sulphobromophthalein: effect of dosage and blocking agents. J. of Clin. Invest. 40, 1648 (1961).
- 13 Kent, G., Popper, H., Dubin, A. and Bruce, C.: The spleen in ethionin-induced cirrhosis. Its role in gamma-globulin elevation. Arch. Path. 64, 398 (1957).
- 14 Lang, N.: Untersuchungen mit J<sup>131</sup>-Bengalrose, J<sup>131</sup>-Biligradin, S<sup>35</sup>-Bromsulphalein und C<sup>14</sup>-Persantin zur Speicher- und Ausscheidungsfunktion der Leber. Rad. Isotope in Klinik u. Forsch. 2, 416 (1962).
- 15 Lang, N. und Manecke, H.: Untersuchungen zur Wirkung des Decholins auf die exkretorische Leberfunktion. Dtsch. Ges. Verd.-Stoffw.krkh., 20. Tag. Kassel, Okt. 1959. Gastroenterologia, Suppl. 95, 211 (1961).
- 16 Lang, N. und Massarrat, S.: Versuche zur immunologischen Enzymbestimmung mit Transaminasen-Antikörpern. Verh. dtsh. Ges. inn. Med. 68, 257 (1962).
- 17 Mallen, M.S.: Relaciones entre el funcionamiento hepatico y las manifestaciones clinicas de alergia en el hombre. J. Congr. Internat.

d' Allergie, 924 (1952). Zitiert im KZB.

- 18 Messarrat, S. und Lang, N.: Immunologie und Enzymkinetik der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) I. Mitteilung. Klin. Wschr. 43, 510 (1965).
- 19 Piller, M.: Eiweißbindung und Verteilung von Bromsulphalein im Organismus. Schweiz. Med. Wschr. 30, 1034 (1963).
- 20 Schmengler, Fr.-E.: Die Bedeutung der Allergie für die Genese parenchymatöser Leberschädigung. Klin. Wschr. 417 (1947).
- 21 Strietzel, M., Hennig, K. und Langer, H.: Die Prüfung der Leberfunktion mit Radio-Bengalrosa. Dtsch. Gesundheitswesen 16, 734 (1964).
- 22 Tisdale, W. A.: Spontaneous colon bacillus bacteremia in Laennec's cirrhosis. Gastroenterology 40, 141 (1961).
- 23 Vega, Mallen, M. S.: Studies on liver function and blood proteins in allergic individuals. Gastroenterology 12, 959 (1949).
- 24 Wheeler, H. O., Cranston, W.J. and Meltzer, J.I.:

Hepatic uptake and biliary excretion of indocyanine green in the dog. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 99, 11 (1958).

- 25 Wiegand, B.D., Ketterer, S.G., Rapaport, E.:  
The use of indocyanine green clearance: A  
test of liver excretory function. Clin. Res.  
7, 290 (1959).
- 26 Wiegand, B.D., Ketterer, S.G., Rapaport, E.:  
The use of indocyanine green for the evaluation  
of hepatic function and blood flow in man.  
Am. J. Digest. 5, 427 (1960).
- 27 Wilde: Wird durch Vaccination mit Bakterien-  
impfstoff die Leberfunktion beeinträchtigt?  
Dtsch. Med. Wschr. 1, 139 (1942).
- 28 Winkler, K. and Tygstrup, N.: Determination  
of hepatic blood flow in man by cardio green.  
Skand. Journ. of Clin. and Laborat. Invest.  
No 3, Vol. 12 (1960).

## Lebenslauf.

=====

Am 30. September 1938 wurde ich als Tochter des Arbeiters Johann Benisch und seiner Ehefrau Adelheid geborene Beutel in Bärn im Sudetenland geboren. Im Herbst 1944 wurde ich in Domstadt im Kreis Sternberg/Sud. eingeschult. Die Grundschule besuchte ich hier bis Anfang Februar 1945. Nach der Vertreibung im Jahre 1946 nahm ich in Volkmarsen im August desselben Jahres den Schulbesuch wieder auf. Im Jahre 1951 bestand ich am Arolser Gymnasium nach 5 Grundschuljahren die Aufnahmeprüfung für die Sexta und legte hier im März 1960 die Reifeprüfung ab.

Ich begann mein Studium im SS 1960 in Marburg, wo ich nach dem WS 1965/66 nach 12 Semestern das Staatsexamen ablegte. Meine Heimatanschrift lautet: Volkmarsen, Fischerstraße 11.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Herren Professoren und Dozenten Beckmann, Behrend, Berendes, Braun-Falco, Brück, Bücher, Cleve, Deicher, Delbrück, Dimroth, Dölle, Drawert, Exner, Gedigk, Gerok, Golenhofen, Hamm, Hanack, Hardewig, Hartmann, Hensel, Heuser, Hildebrandt, Hornung, Huber,

Jacob, Krönke, Lang, Linneweh, Löhr, Lübbers, Mahr,  
Mann, Martini, Marx, Mattes, du Mesnil, Neubauer,  
Niessing, Petry, Prinz, Rodeck, Sauer, Schiff,  
Schleyer, Schmid, Schmidt, Schmitz, Schölmerich,  
Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess, Stender, Stein,  
Straub, Streicher, Vogt, Walcher, Waller, Wegerle,  
Wendt, Würterle.





